

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002137

International filing date: 01 March 2005 (01.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 010 430.1
Filing date: 01 March 2004 (01.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 11 May 2005 (11.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



28 APR 2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 010 430.1

Anmeldetag: 01. März 2004

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Jürgen R ü h e , 79356 Eichstät-
ten/DE;
Dr. Holger K l a p p r o t h , 79108 Freiburg/DE

Bezeichnung: Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Bio-
molekülen an organischen Oberflächen

IPC: C 12 Q, G 01 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 20. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurke



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen unter Verwendung von photoreaktiven Vernetzern mit denen die Sonden-Biomoleküle an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden. Die Immobilisierung findet dabei durch Aufbringen der Sonden-Biomoleküle und der photoreaktiven Polymere und anschließende Vernetzung statt.

Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biomolekülen an organischen Oberflächen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen oder Oberflächen von anorganischen Substraten modifiziert mit selbstorganisierten Monolagen unter Verwendung von photoreaktiven Vernetzern mit denen die Sonden-Biomoleküle an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden. Als Vernetzer werden Polymere oder Copolymere mit photoreaktiven Gruppen verwendet, die nach dem Aufbringen sowohl das Sonden-Biomolekül binden, als auch die kovalente Bindung zur Oberfläche gewährleisten.

In den letzten Jahren haben in der Analytik Techniken immer mehr an Bedeutung gewonnen und es sind zahlreiche Festphasensysteme auf der Grundlage von selbstorganisierten Monolayern (engl. »self-assembled monolayers«, »SAMs«) aus bifunktionellen Molekülen (engl. »Linker«) entwickelt worden, über die spezifisch Probenmoleküle an die Oberfläche des festen Trägers gekoppelt bzw. konjugiert werden, an der dann auch der Nachweis mit Hilfe von geeigneten Markierungen (beispielsweise radioaktiv, gefärbt, fluoreszierend) erfolgt.

Für diese Systeme hat sich in Analogie zu den elektronischen Mikro-Chips die Bezeichnung Sensor-Chips eingebürgert. Im Falle der Konjugation von biologischen Molekülen (sog. »Bio-konjugation«) an solche Sensor-Chips, beispielsweise Oligonukleotiden oder Antikörpern, spricht man auch von Bio-Chips. Die Kopplung an die Trägeroberfläche kann direkt oder indirekt erfolgen. Ein Beispiel für eine indirekte Kopplung ist die Kopplung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz durch

Hybridisierung an ein immobilisiertes, komplementäres Oligonukleotid als Sonde. In diesem Fall hat die Verwendung der Sonde noch den Vorteil der natürlichen Spezifität der Wechselwirkung biologischer Makromoleküle.

5

Typischerweise werden zur Herstellung von Sensor-Chips Oberflächen aus Metall- bzw. Halbmetalloxiden, wie z.B. Aluminiumoxid, Quarzglas, Glas, in eine Lösung von bifunktionellen Molekülen (sog. »Linker«), die beispielsweise eine Halogensilan- (z.B. Chlorsilan-) oder Alkoxysilangruppe zur Kopplung an die Trägeroberfläche aufweisen, getaucht, so daß sich ein selbstorganisierter Monolayer (SAM) bildet. Dieser weist in diesem Fall eine Dicke von wenigen Angström aus. Die Kopplung der Linker an die Proben- oder Sondenmoleküle erfolgt über eine geeignete weitere funktionelle Gruppe, beispielsweise eine Amino- oder Epoxygruppe (EP01176422). Geeignete bifunktionelle Linker für die Kopplung einer Vielzahl von Proben- oder Sonden-Molekülen, insbesondere auch biologischen Ursprungs, an eine Vielzahl von Trägeroberflächen sind dem Fachmann gut bekannt, vgl. beispielsweise »Bioconjugate Techniques« von G. T. Hermanson, Academic Press 1996.

25

Ein Nachteil dieser reaktiven (und dadurch empfindlichen) Oberflächen, z.B. Oberflächen mit Epoxy-, Aldehyd- oder Aminofunktionen, ist deren oft nur begrenzte Haltbarkeit (wenige Wochen), so daß sie unter Luftabschluß und / oder im Dunklen gelagert werden müssen. Zudem sind die resultierenden Bindungen zu den Biomolekülen oder der Oberfläche nicht langfristig stabil. Alle diese Bindungen unterliegen Effekten wie der Hydrolyse, wodurch die Verwendbarkeit und das Anwendungsspektrum gravierend eingeschränkt wird. Insbesondere erlauben es die bestehenden Methoden nicht, auf hydrophile Oberflächen,

30

bzw. hydrophil beschichtete Oberflächen zu drucken, ohne daß die Gefahr besteht, daß die Tropfen zerlaufen und dadurch das Druckergebnis zerstört wird.

- 5 Die Immobilisierung von beispielsweise Nukleinsäuren auf nicht reaktiven Polymer- bzw. Kunststoff/Plastikoberflächen (z. B. als Sonden zur Herstellung von Sensor/Bio-Chips) mit herkömmlichen Methoden ist aber kompliziert und erfordert sehr viel Aufwand.

10

Aufgabe der Erfindung ist daher die Bereitstellung eines einfachen und schnell durchzuführenden Verfahrens zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen oder mit organischen Substanzen modifizierte anorganische Substrate. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es eine im Vergleich zum Stand der Technik wesentlich höhere Bindekapazität auf Trägersubstraten zu erreichen. Bisherige Ansätze wie z.B. EP1144677 konnten dieses Problem nicht zufriedenstellend lösen. Eine weitere Aufgabe dieser Erfindung ist die Bereitstellung einer stabilen Kopplungschemie und einer verbesserten Bedruckbarkeit Bedruckbarkeit von hydrophilen und hydrophoben Oberflächen.

15

20

25

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch folgende technische Lehre gelöst:

- a) ein quellbares, nicht quervernetztes Polymer in dem pro Polymerkette mindestens zwei identische oder unterschiedliche photovernetzbare Gruppen vorhanden sind
- b) mischen des Polymers mit mindestens einem Biomolekül
- c) aufbringen des Gemisches aus b) auf ein Substrat
- d) photovernetzen des Gemisches aus b) auf dem Substrat c)

30

In einer bevorzugten Ausführungsform sind in dem Polymer eine Vielzahl an photovernetzbaaren Gruppen vorhanden, so daß bei dem Vernetzen die Biomoleküle an das Polymer kovalent gebunden werden, die Polymermoleküle an das Substrat kovalent gebunden werden und die Polymerketten untereinander quervernetzt werden.

Der Vorteil der Erfindung liegt in der Möglichkeit, auf unreaktive Oberflächen (z.B. silansierte Glasträger oder Substrate aus handelsüblichen Kunststoffen) ein viskoses Medium, zu drucken, das sehr einfach zu immobilisieren ist, nämlich durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge. Gleichzeitig wird durch diesen Vorgang die Menge an Analyt, die gekoppelt werden kann, wesentlich erhöht, da eine pseudodreidimensionale Matrix aufgebaut wird. Klassische Probleme dreidimensionaler Matrices, wie z.B. Verlauffeffekte des Mediums beim Drucken auf Polymergele, werden auf diese Weise zusätzlich gelöst. Zudem muss nicht auf reaktive (und dadurch empfindliche) Oberflächen gedruckt werden. Reaktive Oberflächen sind z.B. Oberflächen mit Epoxy-, Aldehyd- oder Aminofunktionen. Reaktive Oberflächen weisen oft nur eine begrenzte Haltbarkeit (wenige Wochen) auf und müssen unter Luftabschluß gelagert werden. Keine reaktive Oberfläche bedeutet, dass Träger aus z.B. Polystyrol oder Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet werden können, die jahrelang stabil sind. Ein weiterer Vorteil ist, daß z.B. die Polymeroberflächen nicht durch vorgeschaltete Prozessschritte wie z.B. Plasmaprozesse hydrophilisiert werden müssen, da die Zugänglichkeit der Oberfläche zum Beispiel bei der oben definierten alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens durch das gekoppelte (quellbare, benetzbare) Copolymer hergestellt

wird. Abgesehen davon sind außerdem die Oberflächeneigenschaften des Substrats (z.B. der Sensoroberfläche) in einfacher Weise sehr genau zu kontrollieren. Ein Beispiel für eine wichtige Oberflächeneigenschaft die mit Hilfe des hier beschriebenen Verfahrens einfach kontrolliert werden kann, ist die Benetzbarkeit. Ein weiterer Vorteil ist die vereinfachte Analytik, da im Prinzip nur das Volumen des aufgetragenen Tropfens bestimmt werden muß und sich daraus die Anzahl der immobilisierten Sonden unmittelbar ergibt. Dies ist bei den Verfahren des Standes der Technik zur Bindung von beispielsweise DNA an SAMs kein triviales Unterfangen.

Die Erfindung betrifft ferner eine organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche mit kovalent, vorzugsweise unter Musterbildung (z.B. durch Aufdrucken), darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, die nach einem oben definierten Verfahren erhältlich ist.

Die Erfindung gibt ferner die Verwendung einer organischen Oberfläche wie einer Polymeroberfläche mit unter Musterbildung darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen als Sensor-Chip an und betrifft nach einer weiteren Ausführungsform außerdem ein medizinisches oder diagnostisches Instrument, das eine erfindungsgemäße organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche oder einen damit erhaltenen Sensor-Chip aufweist.

Vorteilhafte und/oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

In einem bevorzugten Verfahren kann/können die photoreaktive(n) Gruppe(n) unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Nitrophenylazid und Deriva-

8

ten und Thymidin oder Derivaten davon ausgewählt werden. Weitere geeignete Photocrosslinker sind im Stand der Technik bekannt und können z.B. von Firmen wie Pierce (www.piercenet.com) bezogen werden. Generell können aber alle chemischen Gruppen verwendet werden, die bei Bestrahlung in der Lage sind radikale oder andere reaktive Gruppen zu bilden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich als organische Oberflächen z.B. Polymeroberflächen wie Oberflächen aus Cycloolefincopolymeren (COCs), Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen oder Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas). Ein geeignetes COC ist zum Beispiel das von Ticona unter dem Handelsnamen »Topas« vertriebene. Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren in Abhängigkeit von den verwendeten photoreaktiven Gruppen für beliebige organische Oberflächen eignet. Geeignet sind somit beispielsweise auch mit organischen Molekülen beschichtete Oberflächen wie mit selbstorganisierten Monolagen (engl. »self-assembled monolayers«, SAMs) beschichtete anorganische Substrate. Diese SAMs können selber völlig unreaktiv sein und somit beispielsweise aus reinen Alkylsilanen bestehen. Zusätzlich zu organischen Substraten sind auch andere Substrate geeignet, sofern diese in der Lage sind bei radikalischen Prozessen mit organischen Molekülen stabile Bindungen einzugehen (z.B. bororganische Verbindungen).

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das Sonden-Biomolekül beispielsweise ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) sein.

Rezeptoren sind, beispielsweise aber nicht ausschließlich: Nukleinsäuren und deren Derivate (RNA, DNA, LNA, PNA), Proteine, Peptide, Polypeptide und deren Derivate (Glycosamine, Antikörper, Enzyme) aber auch Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure und andere Verbindungen, sofern diese spezifische Wechselwirkungen mit mindestens einem zweiten Molekül eingehen können. Weiterhin größere und zusammengesetzte Strukturen wie z.B. Liposomen, Membranen und Membranfragmente, Zellen, Zelllysate, Zellfragmente, Sporen und Mikroorganismen.

Liganden sind, beispielsweise aber nicht ausschließlich: Nukleinsäuren und deren Derivate (RNA, DNA, LNA, PNA), Proteine, Peptide, Polypeptide und deren Derivate (Glycosamine, Antikörper, Enzyme) aber auch Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure und andere Verbindungen, sofern diese spezifische Wechselwirkungen mit mindestens einem zweiten Molekül eingehen können. Weiterhin größere und zusammengesetzte Strukturen wie z.B. Liposomen, Membranen und Membranfragmente, Zellen, Zelllysate, Zellfragmente, Sporen und Mikroorganismen.

Ein spezifisch wechselwirkendes System von komplementären Bindungspartnern kann beispielsweise auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure (PNA) mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Ligand-, Lectin-/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruhen.

Natürlich kann die Nukleinsäure eine DNA oder RNA sein, z.B. ein Oligonukleotid oder ein Aptamer oder auch eine sog. »LNA« wie unter www.proligo.com angeboten oder auch eine einpolyme-

risierbare DNA wie unter dem Handelsnamen »Acrydite« unter www.mosaic-technologies.com angeboten. Auch Peptidnukleinsäuren (PNAs) kommen in Frage

5 Bei dem Antikörper kann es sich beispielsweise um einen polyklonalen, monoklonalen, chimären oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat (mit »funktionell« ist gemeint, daß das Fragment/Derivat ein Antigen binden kann, ohne daß notwendigerweise eine Immunogenität
10 damit verbunden ist) eines derartigen Antikörpers handeln.

Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungsformen und Beispiele anhand von Nukleinsäuren als Sonden-Biomolekülen detaillierter erläutert.
15

Herstellung des Copolymers:

Ein Copolymer kann aus einem eine UV-reaktive Gruppe aufweisenden Monomer, einem reaktiven hydrophilen Monomer gebildet
20 werden. Z.B. 4-Methacryloyloxybenzophenon, Glycidoxymethacrylat, Dimethylacrylamid und Methacrylsäure.

Beispielsweise kann durch Copolymerisation von Dimethylacrylamid und 4-Methacryloyloxybenzophenon in einem 100 : 1
25 (mol/mol) Gemisch durch Zugabe von 1% AIBN (Azobisisobutyronitril) in eine Lösung der Monomeren in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. 10% (v/v) Monomere in Chloroform) hergestellt werden. Das entstandene Copolymer kann durch Fällen
30 mit Diethylether abgetrennt werden.

Das Copolymer kann zum Beispiel in einem geeigneten Lösungsmittel gequollen und zum Beispiel mit 5' Oligothymin modifizierter Nukleinsäure wie DNA gemischt werden.

- 5 Das so substituierte Copolymer kann nun vermessen werden (um den DNA-Gehalt zu bestimmen) und auf fast beliebige organische Polymeroberflächen als Substrat gedruckt werden. Die Immobilisierung des Polymers erfolgt z.B. über UV-Bestrahlung bei 260 nm.

10

Dieses Polymer kann über ein dem Fachmann bekannten Verfahren auf einen PMMA Substrat gedruckt werden. Die Immobilisierung des modifizierten Polymeren erfolgt hier zum einen über eine photoinduzierte Kupplungsreaktion zwischen dem im Polymer

15 enthaltenen Benzophenon-Gruppen und dem Substrat, ausgelöst durch UV-Bestrahlung bei 260 nm und einer photoinduzierten Kupplungsreaktion zwischen dem Oligothymin und dem Polymer.

20

12

Patentansprüche

1. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen
an organischen Oberflächen, bei dem

(a) ein Sonden-Biomolekül mit einem Polymer oder Copolymer das mindestens zwei photoreaktiven Gruppen pro Molekül aufweist, gelöst wird und

(b) die Mischung aus (a) auf eine Oberfläche aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert wird.

2. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen, bei dem

(a) ein Sonden-Biomolekül mit einem Polymer oder Copolymer das mindestens zwei photoreaktiven Gruppen pro Molekül aufweist, gelöst wird und

(b) die Mischung aus (a) auf eine Oberfläche aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer nach dem Drucken quervernetzt wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüchen, wobei als photoreaktive Gruppe(n) (eine) unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Nitrophenylazid und Thymidin oder Derivaten davon verwendet wird/werden.

13

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die photoreaktive(n) Gruppe(n) Ultraviolett-reaktiv ist/sind.
- 5 6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) oder dem in Anspruch 2 definierten Schritt (c) die Aufbringung durch Aufdrucken unter Musterbildung erfolgt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Polymeroberfläche aus Cycloolefincopolymeren, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen oder Polymethylmethacrylat besteht.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei als Sonden-Biomolekül ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) verwendet wird.
- 20 9. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das spezifisch wechselwirkende System von komplementären Bindungspartnern auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Effektor-, Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruht.
- 25
- 30 10. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Nukleinsäure eine DNA oder RNA oder ein Analogon davon ist.

14

12

11. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die DNA oder RNA ein Oligonukleotid ist.
- 5 12. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Antikörper ein polyklonaler, monoklonaler, chimärer oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat eines derartigen Antikörpers ist.
- 10 13. Organische Oberfläche mit kovalent darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
- 15 14. Organische Oberfläche mit unter Musterbildung kovalent darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
15. Verwendung einer organischen Oberfläche nach Anspruch 17 als Sensor-Chip.
- 20 16. Medizinisches oder diagnostisches Instrument, daß eine organische Oberfläche nach Anspruch 16 oder 17 aufweist.